

(54) NOVEL BACTERIUM CAPABLE OF PRODUCING L-GLUTAMIC ACID

(11) 62-44171 (A) (43) 26.2.1987 (19) JP

(21) Appl. No. 61-186061 (22) 7.8.1986

(71) KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD (72) RYOICHI KATSUMATA(1)

(51) Int. Cl'. C12N1/20//C12P13/14(C12N1/20,C12R1:13)(C12N1/20,

C12R1:15)(C12P13/14,C12R1:13)(C12P13/14,C12R1:15)

PURPOSE: A novel bacterium belonging to the genus *Corynebacterium*, having sensitivity to lysozyme, capable of producing L-glutamic acid in high yield without being inhibited with biotin even is an excess amount of a biotin-containing medium is used.

CONSTITUTION: A strain belonging to the genus *Corynebacterium* or *Brevibacterium*, capable of producing L-glutamic acid, is used as a parent strain, it is subjected to variation induction treatment to give a variant and a bacterium having sensitivity to lysozyme is selected from the variant. *Corynebacterium glutamicum* KY9703(FERM 4412, NRRL11271) obtained from *Corynebacterium glutamicum* ATCC1303 as a parent strain may be cited as the bacterium. Any of a natural medium and synthetic medium is usable as a medium to cultivate the bacterium. The culture is carried out by shaking culture, aerated spinner culture, etc., under an aerobic condition and the culture temperature is 24~37°C.

(54) METHOD OF CULTIVATING BACTERIUM

(11) 62-44172 (A) (43) 26.2.1987 (19) JP

(21) Appl. No. 60-181562 (22) 19.8.1985

(71) MITSUBISHI GAS CHEM CO INC (72) SEIJI EBINA(2)

(51) Int. Cl'. C12N1/32//C12P19/42,C12P39/00(C12N1/32,C12R1:01, C12R1:05)(C12N1/32,C12R1:01,C12R1:38)

PURPOSE: To produce expensive vitamin B₁ easily and efficiently by the use of inexpensive methanol as a carbon source, by subjecting a bacterium belonging to the genus *Eu bacterium*, etc., capable of assimilating methanol as a carbon source and producing vitamin B₁₂ and a denitrifying bacteria capable of decomposing an organic acid to mixed culture.

CONSTITUTION: A bacterium belonging to the genus *Eu bacterium* or *Butyribacterium*, capable of producing vitamin B₁₂ and a denitrifying bacterium capable of decomposing an organic acid such as acetic acid and/or butyric acid is subjected to mixed culture in the presence of methanol. Consequently, the organic acid formed and accumulated in the culture solution once is decomposed with the denitrifying bacterium so the concentration of the organic acid in the culture solution is reduced to < concentration to inhibit growth of the bacterium capable of producing vitamin B₁₂. Therefore, the mold concentration is further improved while keeping the high content of vitamin B₁₂ of the bacterium capable of producing vitamin B₁₂ so productivity of vitamin B₁₂ can be improved.

(54) METHOD OF CULTURE AND DEVICE THEREFOR

(11) 62-44173 (A) (43) 26.2.1987 (19) JP

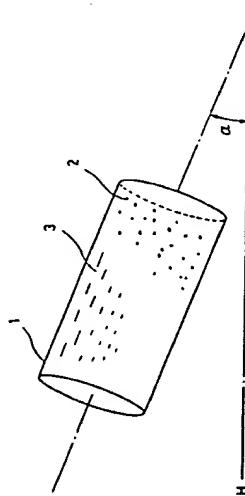
(21) Appl. No. 60-180983 (22) 20.8.1985

(71) JAPAN SYNTHETIC RUBBER CO LTD (72) KEIICHI YAMADA(2)

(51) Int. Cl'. C12N5/00,C12M1/10,C12M3/00

PURPOSE: To cultivate a cell or a plant tissue in high efficiency without applying shear force to a mixed system of a liquid medium and the cell or the plant tissue, by rotating steadily a culture container packed with the mixed system of the liquid medium and the cell or the plant cell round an axis inclined in a specific angle range.

CONSTITUTION: The cylindrical closed culture container 1 is charged with the liquid medium 3 mixed with the cell or plant cell 2 in such a way that inner space of the container 1 is filled with it. Then, in this state, the axis X of the container is inclined at the angle α of 5~55°, especially 20~45°C from the horizontal plane and rotated at a fixed speed. By making the container 1 turn on its axis in this way, after an initial period is passed, the medium 3 in the container 1 and the mixed system are rotated in one piece with the container by the viscosity of the medium 3 in a state free from mechanical flow. Consequently, the cell or plant cell 2 will hardly change a relative position to the medium 3 nor an existing position to the outside of the container 1. Gravity is successively applied to the cell or plant tissue 2 in the container 1 successively in different directions, the cell or plant tissue is dispersed into the medium 3 in a good dispersion degree and the culture is efficiently carried out.



⑫ 公開特許公報 (A) 昭62-44171

⑬ Int. Cl.
 C 12 N 1/20
 // C 12 P 13/14
 (C 12 N 1/20
 C 12 R 1:13)
 (C 12 N 1/20
 C 12 R 1:15)
 (C 12 P 13/14
 C 12 R 1:13)
 (C 12 P 13/14
 C 12 R 1:15)

識別記号 庁内整理番号
 7115-4B
 A-7236-4B

⑭ 公開 昭和62年(1987)2月26日

審査請求 有 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 レーグルタミン酸生産性新規微生物

⑯ 特願 昭61-186061

⑰ 出願 昭53(1978)3月14日

⑱ 特願 昭53-28821の分割

⑲ 発明者 勝亦 瞭一 相模原市文京1-13-8

⑲ 発明者 高山 健一郎 厚木市高尾1丁目9番10号

⑲ 出願人 協和醸造工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

明細書

1. 発明の名称

レーグルタミン酸生産性新規微生物

2. 特許請求の範囲

(1) コリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、リゾチームに感受性を有し、培地中に存在する過剰のビオチンによってレーグルタミン酸の生産が抑制されない性質を有する微生物。

(2) 該微生物がコリネバクテリウム・グルタミムまたはプレビバクテリウム・フラブムに属する菌株から選ばれる特許請求の範囲1の微生物。

(3) 該微生物がコリネバクテリウム・グルタミム KY 9703 (微研菌第4412、NRRL 11271)、コリネバクテリウム・グルタミム KY 9705 (微研菌第4413、NRRL 11272)、およびプレビバクテリウム・フラブム KY 9733 (微研菌第4414、NRRL 11273) から選ばれる特許請求の範囲2の微生物。

3. 発明の詳細な説明

本発明はコリネバクテリウム属またはプレビバクテリウム属に属し、リゾチームに感受性を有し、

培地中に存在する過剰のビオチンによってレーグルタミン酸の生産が抑制されないレーグルタミン酸生産性新規微生物に関する。

生育にビオチンを要求するレーグルタミン酸生産菌のレーグルタミン酸生産性は培地中のビオチン濃度と極めて密接な関係があり、生育に対して制限量のビオチン濃度のときはじめてレーグルタミン酸を生産できる。一方安価な培地の粗原料として利用される蔗糖蜜、蛋白加水分解物などはビオチンを多量に含有している。これら粗原料を含有する培地にレーグルタミン酸生産菌を培養する方法としては特公昭37-1695号公報、特公昭38-25288号公報などに記載されている方法が知られているが、工業的にはさらに優れた方法が望まれている。

本発明者らは、安価な粗原料を用い、過剰量のビオチンの作用を回避してレーグルタミン酸を製造する方法につき研究した結果、従来のレーグルタミン酸生産菌を親株として変異誘導したリゾチームに感受性を有する変異株を用いれば、過剰のビオチン含有培地を用いても、ビオチンによる抑制を受けることなく高い収率でレーグルタミン酸を生産できることを見出した。

以下本発明をさらに詳細に説明する。

本発明によればコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属し、リゾチームに感受性を有し、培地中に存在する過剤のビオチンによってレーグルタミン酸の生産が抑制されない性質を有する微生物を培地に培養すれば培地中にレーグルタミン酸が蓄積するので、これを採取することにより高収率にレーグルタミン酸が得られる。

本発明に用いる微生物はコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属し、リゾチームに感受性を有し、培地中に存在する過剤のビオチンによってレーグルタミン酸の生産が抑制されない性質を有する微生物であればいかなる菌株をも用いることができる。一般にはコリネバクテリウム属またはブレビバクテリウム属に属し、レーグルタミン酸生産能を有する菌株を親株とし、これを変異誘導処理して得られた変異株からリゾチームに感受性を有するものを選択し、これを用いる。変異誘導の方法としては、紫外線照射、放射線照射、変異誘起剤処理等の通常の方法が用いられる。変異誘導された変異株からリゾチームに感受性を有する菌株を選択するには、親株が生育可能な濃度のリゾチームを含有する培地で生育できなくて、リゾチーム無添加培地では親株と同様に生育できるものを選べばよい。従って、ここでリゾチーム

に感受性であるとは、リゾチームに対する最小阻止濃度が親株より低いことを意味する。また培地中に存在する過剤のビオチンによってレーグルタミン酸の生産が抑制されないとは、培地中に存在する過剤のビオチンによるレーグルタミン酸生産の抑制が実質的に無視できる程度のものであることを意味する。具体的には前記のごとき粗原料を用いた場合でも過剤のビオチンによる影響をうけることなくレーグルタミン酸の生産ができるることを意味する。

本発明に用いる具体的に好適な菌株の一例としては、コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC 13032 を親株として得られたコリネバクテリウム・グルタミクム KY9703 (微生物研究室第4412号、N R R L 11271)、コリネバクテリウム・グルタミクム KY9705 (微生物研究室第4413号、N R R L 11272) およびブレビバクテリウム・ラブム ATCC 14067 を親株として得られたブレビバクテリウム・ラブム KY9733 (微生物研究室第4414号、N R R L 11273) があげられる。

コリネバクテリウム・グルタミクム ATCC 13032 を親株としてリゾチーム感受性変異株を取得する方法について以下具体的に説明する。

400 mg/l、MnCl₂ · 4H₂O 2 mg/l、ZnSO₄ · 7H₂O 0.8 mg/l、CuSO₄ · 5H₂O 0.4 mg/l、Na₂B₄O₇ · 10H₂O 0.09 mg/l、(NH₄)₂MoO₄ · 4H₂O 0.04 mg/l、ビオチン 3.0 µg/l、サイアミン塩酸塩 1 mg/l、システィン塩酸塩 2.0 µg/l および寒天 2.0 g/l の組成を有する培地 (殺菌前 pH 7.0)。

30°Cで2日間培養後、CA培地で生育し、CLA培地で生育しない菌をリゾチーム感受性変異株として得る。MA培地で親株と同様に生育する自己栄養性でリゾチームに対して感受性の変異株は試験した6,000コロニーの中に110株得られた。この110株中17株がビオチン過剤培地でも多量のレーグルタミン酸を生産する能力を有していた。コリネバクテリウム・グルタミクム KY9703 および KY9705 はかくして得られた変異株の一例である。

ブレビバクテリウム・ラブム ATCC 14067 を親株とする変異誘導も上記と同様に行って、ブレビバクテリウム・ラブム KY9733 を得た。

上記例示の変異株のMA培地、CA培地、CLA

該親株を粉末ブイヨン (極東型薬社製) 20 g/l および酵母エキス 5 g/l の組成を有する培地 (殺菌前 pH 7.2、以下 C 培地という) に植菌し 30°C で振盪培養する。中期對数期で培養を中止し、集菌し、生理食塩水で洗浄後、M/20 トリス・マレート緩衝液 (pH 6.0) に 5×10^6 細胞/ml になるよう懸濁する。この懸濁液に最終濃度 500 mg/ml になるようにニトロソグアニジンを加え、25°C で 30 分間放置し、遠心分離により固体を集め、同一緩衝液で菌体を洗浄後、生理食塩水に懸濁し、適宜生理食塩水で希釈して C 培地にさらに 2 g/ds の寒天を含む固体培地 (以下 CA 培地という) に塗りつける。これを 30°C で 2 日間培養し、生じたコロニー (約 6,000) を次の 3 種類の固体培地にレプリカ法により塗りつける。

- ① CA 培地
- ② CLA 培地 : CA 培地を加熱殺菌後、冷却して培地の温度が 45°C まで下がってから 200 mg/l になるようリゾチームを添加した培地。
- ③ MA 培地 : グルコース 10 g/l、NH₄Cl 4 g/l、尿素 2 g/l、KH₂PO₄ 1 g/l、K₂HPO₄ 3 g/l、FeSO₄ · 7H₂O 1.0 mg/l、MgSO₄ · 7H₂O

培地での生育およびリゾチーム感受性度について親株と比較した結果を第1表に示す。3種類の固体培地上での生育はレブリカ法で塗りつけ、30℃で2日間培養後判定した。表中生育欄の+は菌の生育が観察されたものを、-は生育が観察されなかったものを示す。また表中リゾチーム感受性度は次のように試験した。すなわちC培地にて24時間30℃液体振盪培養した菌を葉園後、生理食塩水にて適当に希釈して固体の懸滴液をつくる。この懸滴液10⁴細胞相当を倍々系列の濃度のリゾチームを含有するCA培地に滴下接種し、30℃で2日間培養する。菌の生育がまったくみとめられない最小のリゾチーム濃度を菌のリゾチーム感受性度（最小生育阻止濃度）とした。

第1表

菌株	生育			リゾチーム感受性度 最小生育阻止濃度 (MIC μ g/ml)
	MA培地	CA培地	CLA培地	
コリオバクテリウム・ グムタミクル KY 9703	+	+	-	100
KY 9705	+	+	-	25
ATCC 13032	+	+	+	800
フレビオバクテリウム・フジ 7L KY 9733	+	+	-	50
ATCC 14067	+	+	+	800

オン交換出脂による吸脱着法、液相品析法、等電点品析法など、従来のレーグルタミン酸の製造において常用される諸方法を適宜使用して行うことができる。

以下に本発明の実施例を示す。

実施例1.

グルコース4.0g/l、(NH₄)₂SO₄ 2g/l、MgSO₄·7H₂O 0.5g/l、KH₂PO₄ 0.5g/l、K₂HPO₄ 1g/l、Fe₂SO₄·7H₂O 2mg/l、MnSO₄·4H₂O 2mg/l、サイアミン塩酸塩 1mg/l、フェノールレッド 1.0mg/l およびビオチン 2μg/l あるいは 100μg/l の組成を有する培地を調製し、pHを7.0に調整した後、30mlずつ300ml容の枝付フラスコに入れ、115℃で15分間加熱殺菌した。冷却後、別に加熱殺菌した尿素液 2g/l になるように添加した。この培地に第2表に示した菌を接種し30℃で振盪培養を行った。培養中培養液をpH 6.5~8.0に保つため12時間目と20時間目の2回尿素液を4g/l になるように添加し、32時間で培養を終了した。かくして培養液中に蓄積したレーグルタミン酸量は、第2表に示す通りである。培養液1lから菌体を除去し、澄紹し、塩酸でpH 3.2に調整し、冷却してレーグルタミ

本発明の微生物を培養するための培地は、炭素源、窒素源、無機化合物、その他の栄養素を適当に含む培地ならば、通常レーグルタミン酸生産に用いられる天然培地、合成培地のいずれも使用できる。たとえば炭素源としては酵母、ブドウ糖、糖蜜などの糖質および澱粉糖化液などが、窒素源としてはアンモニア、硫酸アンモニウム、塩酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、磷酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、水酸化アンモニウム、クエン酸アンモニウム、酒石酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、尿素などの有機無機窒素化合物、ペプトン、肉エキス、コーンスチーブリカなどの天然栄養源などが、無機化合物としては磷酸第一カリ、磷酸第二カリ、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、硫酸第一鉄、塩化第二鉄、硫酸マンガン、塩化マンガンなどが、その他の栄養源としてはビオチン、サイアミンなどが用いられる。

培養は振盪培養、通気振盪培養などの好気的条件で行い、培養温度は24~37℃とくに28~33℃が好適である。培養中は適当な中和剤を用いてpHを6~9に調整するのが好ましい。培養は1~3日間行えば培養液中に蓄積したレーグルタミン酸が生成蓄積する。培養液からレーグルタミン酸の採取は、菌体を除去した上清液から、イ

ン酸の粗結晶を得た。粗結晶の量(g)を括弧内に示す。

第2表

菌株	レーグルタミン酸蓄積量(g/l)	
	ビオチン 2μg/l 添加培地	ビオチン 100μg/l 添加培地
コリオバクテリウム・グムタミクル KY 9703	9.1(6.7)	9.3(6.9)
KY 9705	14.5(10.7)	14.0(10.4)
ATCC 13032	9.0	0.2
フレビオバクテリウム・フジ 7L KY 9733	8.8(6.5)	8.4(6.2)
ATCC 14067	7.4	0.1

実施例2.

実施例1で用いた培地中グルコースを甘蔗漬蜜（グルコースとして4.0g/l相当量）に換え、加熱殺菌後の培地をpH 7.0に再調整する以外は実施例1と同様に行った。培養液中に蓄積したレーグルタミン酸量を第3表に示す。

第 3 表

菌 株	L-アーベルタミン酸蓄積量 (mg/ml)
コリネバクテリウム・ダルタミクム	
KY9703	11.2
KY9705	15.6
ATCC13032	0.3
ブレビバクテリウム・フラブム	
KY9733	9.7
ATCC14067	0.2

特許出願人(102) 協和醸酵工業株式会社

代表者 加藤洋夫

